

## МИЕЛОПЕРОКСИДАЗОЙ ДЕГРАНУЛЯЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

Григорьева Д.В.<sup>1</sup>, Горудко И.В.<sup>1</sup>, Соколов А.В.<sup>2,3,4</sup>, Шамова Е.В.<sup>1</sup>,  
Черенкевич С.Н.<sup>1</sup>, Панасенко О.М.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН,  
Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>ФГБУН НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Секреторная дегрануляция клеток – это высвобождение протеолитических ферментов и других компонентов из гранул и меньших по размеру запасующих органелл. При экзоцитозе нейтрофилы высвобождают широкий спектр антимикробных белков (ферментов), многие из которых обладают цитотоксическим действием. Одним из высвобождающихся ферментов является гемсодержащий гликопротеид азурофильных гранул нейтрофилов – миелопероксидаза (МПО). Известно, что помимо проявления своей ферментативной активности (продукция высокореакционных соединений, составляющих основу МПО-зависимой антимикробной системы нейтрофилов), МПО способна связываться с плазматической мембраной и регулировать структурно-функциональные свойства клеток. Установлено, что МПО является аутокринным модулятором активации нейтрофилов (задержка апоптоза, продукция активных форм кислорода, дегрануляция и др.). Поскольку реализация основных функций нейтрофилов зависит от реорганизации цитоскелета, целью данной работы явилось изучение роли цитоскелета в дегрануляции нейтрофилов, активированных МПО в условиях воспаления.

Дегрануляционную способность нейтрофилов при действии МПО оценивали по выходу эластазы, маркера азурофильных гранул, лактоферрина, маркера специфических гранул, и лизоцима, содержащегося в обоих типах гранулах. Активность лизоцима в супернатантах определяли по скорости лизиса бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus*. Концентрацию лактоферрина в супернатантах определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов ELISA. Выход эластазы оценивали флуоресцентным методом с использованием специфического субстрата – MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA. Как видно из данных, представленных в таблице 1, добавление МПО (100 нМ) к нейтрофилам достоверно ( $p < 0,05$ ) увеличивало содержание эластазы, лактоферрина и лизоцима во внеклеточной среде, что свиде-

тествует об иницировании ферментом дегрануляции азурофильных и специфических гранул.

Таблица 1 - Влияние МПО на дегрануляцию нейтрофилов

	Выход лизоцима, % от общей ферментативной активности	Выход лактоферрина, мкг/мл	Скорость накопления флуоресцирующего продукта, отн. ед.
Базальный уровень	16,47±1,05	0,60±0,11	0,27±0,08
МПО (100 нМ)	24,20±0,80	1,01±0,13	0,54±0,04

Установлено, что цитохалазин В (2,5 мкМ) усиливал МПО-индуцированный экзоцитоз лизоцима, эластазы и лактоферрина по сравнению со стимуляцией клеток одной МПО на 19,5±3,1 %, 37,1±8,4 % и 15,3±3,5 %, соответственно. Колхицин (10 мкМ) практически не оказывал влияния на выход лизоцима из клеток при действии МПО. Поскольку цитохалазин В вызывает диссоциацию фибриллярного актина, а колхицин связывается с микротрубочками и способствует их разборке, полученные данные свидетельствуют о том, что дегрануляционный ответ нейтрофилов на МПО зависит от состояния актинового цитоскелета этих клеток.

Кроме того, методом лазерной конфокальной микроскопии была осуществлена визуализация F-актина с помощью флуоресцентного красителя флуоресцеин-фаллоидина, который избирательно связывается с микрофиламентами. Выявлено, что интактные нейтрофилы имели округлую форму с четко выраженным кортикальным цитоскелетом. В присутствии МПО происходило перераспределение F-актина и образование псевдоподий. Мономерная форма МПО, а также МПО, модифицированная НОС1, теряли способность иницировать реорганизацию актинового цитоскелета.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что после добавления МПО к нейтрофилам происходит полимеризация примембранного F-актина и его перераспределение с образованием псевдоподий, что, в конечном итоге, приводит к усилению дегрануляции клеток.

*Работа поддержана РФФИ (гранты 15-34-50014 и 14-04-900007), БРФФИ (грант Б14Р-035).*